



#15
Harry
Jul. 14, 01

Practitioner's Docket No. 30394-1027

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: VAN VENROOIJ Group No.: 1644
Application No.: 0 9/ 308,150
Filed: September 30, 1999 Examiner: A. DeCloux
For: PEPTIDE DERIVED FROM AN ANTIGEN

RECEIVED

JUL 11 2001

TECH CENTER 1600/2900

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPIES

Attached please find the certified copy of the foreign application from which priority is claimed for this case:

Country: Netherlands
Application Number: 1004539
Filing Date: 15 November 1996

Country:
Application Number:
Filing Date:

WARNING: "When a document that is required by statute to be certified must be filed, a copy, including a photocopy or facsimile transmission of the certification is not acceptable." 37 C.F.R. § 1.4(f) (emphasis added).

Reg. No.: 43,924

Tel. No.: (505) 998-1500

Customer No.: 005179

SIGNATURE OF PRACTITIONER Stephen A. Slusher

PEACOCK, MYERS & ADAMS, P.C.

(type or print name of practitioner)

Post Office Box 26927

P.O. Address

Albuquerque, New Mexico 87125-6927

NOTE: The claim to priority need be in no special form and may be made by the attorney or agent, if the foreign application is referred to in the oath or declaration, as required by § 1.63.

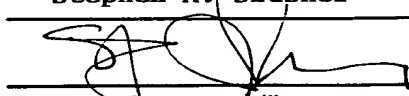
CERTIFICATE OF MAILING (37 C.F.R. § 1.8a)

I hereby certify that this paper (along with any paper referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Stephen A. Slusher

(type or print name of person mailing paper)

Date: July 2, 2001


Signature of person mailing paper

(Transmittal of Certified Copies[5-5])



KINGDOM OF THE NETHERLANDS

PATENT OFFICE

It is herewith stated, that in the Netherlands on
15 November, 1996, under number 1004539, in the name of
STICHTING SCHEIKUNDIG ONDERZOEK NEDERLAND

of Den Haag and

STICHTING VOOR DE TECHNISCHE WETENSCHAPPEN

of Utrecht

a patent application has been filed for:

"Peptide derived from an antigen recognized by autoantibodies
from patients with rheumatoid arthritis, antibody directed
against said peptide, and a method of detecting auto-immune
antibodies"

and that the documents appended herewith fully correspond with
the original documents handed in with said application.

Rijswijk, 7 June, 2001

On behalf of the President
of the Patent Office,

(signature)

drs. N.A. Oudhof

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



#15
9-308150

KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 15 november 1996 onder nummer 1004539,
ten name van:

STICHTING SCHEIKUNDIG ONDERZOEK NEDERLAND

te Den Haag en

STICHTING VOOR DE TECHNISCHE WETENSCHAPPEN

te Utrecht

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Peptide afgeleid van een door auto-antilichamen van patiënten met reumatoïde artritis herkend
antigeen, antilichaam daartegen en werkwijze voor het detecteren van auto-
immuunantilichamen",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 7 juni 2001

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

drs. N.A. Oudhof

● 1004539

UITTREKSEL

De uitvinding heeft betrekking op een peptide afgeleid van een door auto-antilichamen herkend antigeen, welk peptide reactief is met de auto-immuunantilichamen van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt. Het peptide volgens
5 de uitvinding bezit een gemodificeerd arginine-residu. De uitvinding heeft tevens betrekking op antilichamen tegen het peptide en een werkwijze voor het detecteren van auto-immuunantilichamen. Licentieverlening mogelijk.

7^{II}

1004539

NL 42924-A1/ho

Peptide afgeleid van een door auto-antilichamen van patiënten met reumatoïde artritis herkend antigeen, antilichaam daartegen en werkwijze voor het detecteren van auto-immuunantilichamen

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een peptide afgeleid van een door auto-antilichamen van patiënten met reumatoïde artritis herkend antigeen, welk peptide reactief is met van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt afkomstige auto-immuunantilichamen.

Een dergelijk peptide is bekend uit de Europese octrooiaanvraag 0 511 116 (Clonatec S.A.). In deze aanvraag wordt een antigeen beschreven dat een fragment van filaggrine of profilaggrine omvat. Het peptide wordt herkend door auto-immuunantilichamen die specifiek zijn voor reumatoïde artritis. Reumatoïde artritis (RA) is een systemische auto-immuunziekte. Het is de meest voorkomende gewrichtsontstekingsziekte, is chronisch en kan leiden tot vergaande lichamelijke ongeschiktheid.

De onderhavige uitvinding beoogt een peptide te verschaffen dat reactief is met van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt afkomstige auto-immuunantilichamen, welk peptide geschikt is voor diagnostisch onderzoek met verhoogde specificiteit en tevens bruikbaar is voor verdere doelen zoals het verkrijgen (opwekken, selecteren en isoleren) van poly- en monoklonale antilichamen.

Hiertoe wordt het peptide volgens de uitvinding gekenmerkt doordat het afgeleide, met auto-immuunantilichamen reactieve peptide correspondeert met een een codon voor een arginine-residu bevattend deel van een voor het antigeen coderend mRNA-molecuul, en het arginine-residu in het afgeleide, met auto-immuunantilichamen reactieve peptide een gemodificeerd arginine-residu is.

Het peptide volgens de uitvinding dat een gemodificeerd arginine-residu bezit is op verrassenderwijze zeer geschikt gebleken voor de specifieke diagnose van reumatoïde artritis.

Er is voor RA tot op heden geen specifieke serologi-

87

sche test beschikbaar. De enige test die vaak wordt gebruikt berust op het bepalen van reumafactoren (RF; ref. 1) welke bij 70% van de RA-patiënten worden aangetroffen. Echter, deze test is weinig specifiek en kenmerkt zich door een relatief
5 hoog aantal vals-positieven. Van patiënten die aan systemische lupus erythematosus lijden is het percentage vals-positieven circa 20%, en bij gezonde individuen circa 5%.

Bij voorkeur wordt het peptide gekenmerkt doordat het gemodificeerde arginine-residu een zijketen bezit met
10 formule I van het formuleblad, waarbij

$$\begin{aligned} X &= \text{NH}_2, \text{CH}_3, \text{NHCH}_3 \text{ of } \text{N}(\text{CH}_3)_2; \\ Y &= \text{O}, \text{NH}, \text{NHCH}_3 \text{ of } \text{N}(\text{CH}_3)_2; \\ Z &= \text{O}, \text{NH} \text{ of } \text{CH}_2; \text{ en} \\ n &= 2, 3 \text{ of } 4, \text{ onder de voorwaarde dat wanneer } X = \end{aligned}$$

15 NH_2 en $Z = \text{NH}$, Y geen NH is; en in het bijzonder is het gemodificeerde arginine-residu een citrulline-residu. Voor citrulline is $X = \text{NH}_2$, $Y = \text{O}$, $Z = \text{NH}$ en $n = 3$.

Een peptide dat de voorkeur geniet is het peptide gekozen uit de groep van peptiden met de formule II, III en
20 IV van het formuleblad.

Zo kan met het peptide met de formule II bij circa 36% van de patiënten die lijden aan reumatoïde artritis worden vastgesteld dat zij daaraan lijden en is bij andere auto-immuunziekten en gezonde individuen het aantal vals
25 positieven minder dan 2%.

Volgens een gunstige uitvoeringsvorm is het peptide een cyclisch peptide, bijvoorbeeld door aanwezigheid van een cystine-residu.

Een dergelijk cyclisch peptide vertonen in sommige
30 gevallen een verhoogde immunologische affiniteit.

Bij voorkeur is het cyclische peptide het peptide met de formule V van het formuleblad.

Bij voorkeur is het peptide een synthetisch peptide.

Door middel van organische synthese kan het reactie-
35 ve peptide volgens de uitvinding in grote hoeveelheden zuiver worden verkregen, hetgeen het op grote schaal immunologisch testen mogelijk maakt.

Volgens een alternatieve uitvoeringsvorm wordt het peptide volgens de uitvinding gekenmerkt doordat het peptide

is verkregen door het proteolytisch behandelen van (pro)filaggrine, scheiding van door proteolyse gevormde peptidefragmenten en gevolgd door selectie op de aanwezigheid van een gemodificeerd arginine-residu in een bij de proteolytische behandeling gevormd peptide.

5 Aldus kunnen peptiden worden geïdentificeerd waarmee de gevoeligheid van een test op reumatoïde artritis kan worden verhoogd. Onder gevoeligheid wordt in de onderhavige aanvraag verstaan het vermogen van een test een aan
10 reumatoïde artritis lijdende patiënt als zodanig te identificeren.

Volgens een gunstige uitvoeringsvorm is het antigeen (pro)filaggrine, en is het peptide reactief met van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt afkomstige auto-immuun-
15 antilichamen reactief met (pro)filaggrine.

Het is gebleken dat het peptide zeer geschikt is voor het met hoge specificiteit (weinig vals-positieven) testen op reuma.

De onderhavige uitvinding heeft tevens betrekking op
20 een antilichaam kruisreactief met een antilichaam opgewekt tegen een peptide volgens de uitvinding.

Een dergelijk antilichaam is bruikbaar voor het aantonen van reumatoïde artritis met behulp van coupes van biopten en immunologische testen van het sandwich-type.

25 Bij voorkeur is het antilichaam een monoklonaal antilichaam.

Volgens een verdere voorkeursuitvoeringsvorm is het antilichaam verkregen onder gebruikmaking van een peptide volgens de uitvinding als antigeen.

30 Een geschikt antilichaam volgens de uitvinding wordt gekenmerkt doordat het kruisreactief is met het antilichaam zoals dat wordt geproduceerd door Escherichia coli TG1 met plasmide RA3, gedeponeerd bij het Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Nederland, onder aanwinstnummer CBS143.96

35 Tenslotte heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze voor het detecteren van auto-immuunantilichamen tegen reumatoïde artritis.

De werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt doordat ten minste één immunologisch reactief molecuul geko-

zen uit de groep bestaande uit een peptide volgens de uitvinding en een antilichaam volgens de uitvinding, in een immunologische test wordt toegepast.

5 Naast een verhoogde gevoeligheid worden verdere voordelen bereikt, in het bijzonder een betere reproduceerbaarheid, kwantitatieve informatie en betere bruikbaarheid voor prognostische toepassingen.

De uitvinding zal thans worden toegelicht aan de hand van het volgende voorbeeld.

10 Materiaal en methoden.

Peptide synthese: Peptiden werden geselecteerd voor synthese op basis van aminozuurvolgorden afgeleid van bekende cDNA-volgorden van menselijk profilaggrine (ref. 2; ref. 3). De peptiden werden op een vaste fase gesynthetiseerd onder
15 gebruikmaking van de werkwijze beschreven door Schellekens et al. (ref. 4). De peptiden waren voor ten minste 95% zuiver, zoals bepaald aan de hand van het elutiepatroon met behulp van reversed phase chromatografie en de relatieve absorptie bij 214 nm. De samenstelling van de peptiden werd bevestigd
20 met behulp van massa-spectrometrie (MALDI-MS). Alle peptiden werden gesynthetiseerd als peptide-amiden.

TABEL 1

Gesynthetiseerde peptiden

5 De peptiden waarvan de naam begint met "cf" zijn op basis van het C-eindstandige uiteinde (aminozuren 306-324); en de peptiden waarvan de naam begint met "nf" zijn gebaseerd op de volgorde nabij het N-eindstandige uiteinde (aminozuren 18-32 voor nfc1). Aminozuurvolgorden op basis van cDNA van een
10 profilaggrine-repeat.

naam	peptide volgorde*
cfcl	S H Q E S T <u>X</u> G R S R G R S G R S G S
cfc2	S H Q E S T R G <u>X</u> S R G R S G R S G S
cfc3	S H Q E S T R G R S <u>X</u> G R S G R S G S
cf	S H Q E S T R G R S R G R S G R S G S
cfA	S H Q E S T A G R S R G R S G R S G S
cfE	S H Q E S T E G R S R G R S G R S G S
cfQ	S H Q E S T Q G R S R G R S G R S G S
nfc1	T G P S T R G R Q G S <u>X</u> H E
nf	E S S H G W T G P S T R G R Q G S R H E

* (A = alanine; G = glycine; H = histidine; E = glutamine-zuur; P = proline; R = arginine; Q = glutamine; S = serine; T = threonine; W = tryptofaan; X = citrulline)

25 Detectie met behulp van ELISA.

De peptiden werden covalent gekoppeld via een N-oxysuccinimide-oppervlak aan de putjes van microtiter platen met 96 putjes (Costar amide-bindingsplaten) in een hoeveelheid van 1 µg/putje. Het koppelen geschiedde gedurende 16 uur bij 4°C en
30 pH 9,0. De platen werden gedurende 1 uur geblokt met 2% runderserumalbumine. De sera werden 200-voudig verdund in een verdunningsoplossing (0,3% BSA, 350 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 vol.%/vol.% Triton X-100, 0,5 % gew.%/vol.% Na-desoxycholaat, 0,1% SDS) aangevuld met 10% normaal konijns-
35 serum, en gedurende 1 uur bij kamertemperatuur geïncubeerd. Na wassen van de platen (3 keer met PBS met 0,05 vol.% Tween-®20), werd 100 µl anti-humaan IgG geconjugeerd met peroxidase (Dako P214), 1000 keer verdund in verdunningsbuffer, aan de putjes toegevoegd. Na gedurende 1 uur incuberen bij kamertem-
40 peratuur werden de platen 3 keer gewassen met PBS/Tween®20, en gebonden antilichamen werden gedetecteerd met tetramethylbenzidine als substraat. De reactie werd na 10 minuten gestopt door het toevoegen van 100 µl 2 M zwavelzuur per putje.

Uitlezen geschiedde bij 450 nm. Sera met een OD₄₅₀ van 0,2, na aftrekken van de blanco voor het betreffende serum (een putje waarbij geen peptide was gekoppeld), werden als positief beschouwd.

5 Resultaten.

De resultaten zijn samengevat in tabel 2. In het totaal werd sera van 288 patiënten met reumatische aandoeningen gebruikt, waarvan 132 afkomstig van patiënten die leden aan reumatoïde artritis.

10

TABEL 2

Resultaten met peptide cfc1 (formule I van het formuleblad).

Serumomschrijving	n	aantal positieve sera %
RA(RF+)	109	42 (39%)
RA(RF-)	23	6 (26%)
15 reumatische aandoeningen anders dan RA	156	2 (1,3%)
systemische lupus erythematosus	50	1
20 primair syndroom van Sjögren	35	0
25 polymyositis/dermatomyositis	26	0
Gezonde individuen	59	0

30

Van de in het totaal 132 sera van patiënten die lijden aan reumatoïde artritis waren 48 positief met het peptide cfc1 (formule I van het formuleblad). Derhalve was de gevoeligheid met peptide cfc1 36% (48/132). Sera waren eveneens reactief met de peptiden cfc2 en cfc3 met percentages van respectievelijk 18% (24/132) en 26% (35/132). Van de 24 sera reactief met cfc2 waren 13 sera niet reactief met cfc1. Het peptide cfc2 verbetert dus de gevoeligheid van de test met 10%. Van de 35 sera reactief met cfc3 waren geen sera die niet reactief waren met cfc1 en cfc2. Peptide cfc3 draagt dus bij gebruik in combinatie met cfc1 en cfc2 niet bij tot een verhoogde gevoeligheid van de test. Bij deze percentages wordt opgemerkt dat deze afhankelijk zijn van de door aanvraagster aangelegde drempelwaarde voor de specificiteit. Dezelfde meetgegevens (uit de ELISA-experimenten) kunnen

40

worden geïnterpreteerd als een gevoeligheid van ca. 50-60% door te kiezen voor een iets geringere specificiteit, welke overigens nog steeds veel beter is dan met de bekende reumafactortest (ref. 1) kan worden bereikt.

5 Sera van patiënten lijdend aan diverse infectieziekten (borrhelia, syfilis, malaria, endocarditis, legionella, tuberculose, mycoplasma, chlamydia, yersinia, salmonella, parvovirus B19, Epstein-Barr virus, rubella, schistosomiasis, toxoplasma, leismaniasis, Chagas) werden getest op de aanwezigheid van antilichamen reactief met cfcl. Van de 308 geteste sera waren er 9 positief. De specificiteit was derhalve 97%, een aanmerkelijke verbetering ten opzichte van de RF-test.

15 Varianten van cfcl waarbij citrulline werd vervangen door een neutraal (alanine; cfA), zuur (glutaminezuur; cfE) of amide (glutamine; cfQ) residu bleken niet immunologisch reactief te zijn. Hetzelfde geldt voor het controle peptide cf, dat geen gemodificeerd arginine-residu bezit.

20 Een cyclische variant (met de formule V van het formuleblad, waarin twee cysteïne residuën (C) middels een zwavelbrug zijn verbonden) van cfcl werd met behulp van de hierboven beschreven ELISA getest op 132 RA sera. Deze cyclische variant bleek reactief te zijn met 83 sera (63%), hetgeen een verhoging van de gevoeligheid betekent. Van de 156
25 sera van aan andere reumatische aandoeningen dan RA lijdende patiënten bleken er 5 positief (specificiteit 97%). Geen enkel serum van 50 gezonde individuen was positief.

30 Een tweede citrulline gesubstitueerd peptide (nfc1) bleek specifiek reactief met 10% van de RA sera te zijn, maar niet met het controle peptide nf dat geen citrulline bezit. Van de met nfc1 reactieve RA sera waren de meeste niet reactief met cfcl. Derhalve kan de gevoeligheid van een test op reumatoïde artritis worden verhoogd door het toepassen van meer peptiden met een gemodificeerd arginine-residu.

35 Vanzelfsprekend kunnen er meer gemodificeerde arginine-residuen in een peptide aanwezig zijn maar kan het peptide anderzijds ook een of meer niet-gemodificeerde arginine-residuen bezitten.

Aanvraagster houdt het voor mogelijk dat bij andere

auto-immuunziekten eveneens gemodificeerde aminozuren, in het bijzonder die afgeleid van arginine-residuen, een rol spelen bij auto-immuunziekten. Derhalve is de uitvinding tevens gericht op peptiden met gemodificeerde aminozuren welke

5 reactief zijn met auto-antilichamen afkomstig van patiënten lijdend aan andere auto-immuunziekten dan reumatoïde artritis.

REFERENTIES.

- 1) Smolen, J.S., (1996) Autoantibodies in rheumatoid arthritis,
in Manual of biological markers of disease (W.J. van
5 Venrooij en R.N. Maini, red.) deel C Hoofdstuk 1.1 blz. 1-
18. Kluwer Scientific Publishers, Dordrecht.
- 2) McKinley-Grant, L.J., Idler, W.W., Bernstein, I.A., Parry,
D.A.D., Cannizzaro, L., Croce, C.M., Huebner, K., Lessin,
10 S.R. & Steinert, P.M. (1989) Characterization of a cDNA
clone encoding human filaggrin and localization of the
gene to chromosome region 1q21.
Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. 86,
4848-4852.
15
- 3) Gan, S.Q., McBride, O.W., Idler, W.W., Nedialka, M. &
Steinert, P.M. (1990) Organization, structure, and poly-
morphisms of the human profilaggrin gene.
Biochemistry 29, 9432-9440.
20
- 4) Schellekens, G.A., Lasonder, E., Feijlbrief, M., Koedijk,
D.G.A.M., Drijfhout, J.W., Scheffer, A.J., Welling-Wester,
S & Welling, G.W. (1994) Identification of the core resi-
25 dues of the epitope of a monoklonal antibody raised
against glycoprotein D of herpes simplexvirus 1 by scree-
ning of a random peptide library.
The European Journal of Immunology 24, 3188-3193.

CONCLUSIES

1. Peptide afgeleid van een door auto-antilichamen van patiënten met reumatoïde artritis herkend antigeen, welk peptide reactief is met van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt afkomstig auto-immuunantilichamen, **met het kenmerk**, dat het afgeleide, met auto-immuunantilichamen reactieve peptide correspondeert met een een codon voor een arginine-residu bevattend deel van een voor het antigeen coderend mRNA-molecuul, en het arginine-residu in het afgeleide, met auto-immuunantilichamen reactieve peptide een gemodificeerd arginine-residu is.

2. Peptide volgens conclusie 1, **met het kenmerk**, dat het gemodificeerde arginine-residu een zijketen bezit met formule I van het formuleblad, waarbij

$X = \text{NH}_2, \text{CH}_3, \text{NHCH}_3 \text{ of } \text{N}(\text{CH}_3)_2;$

$Y = \text{O}, \text{NH}, \text{NHCH}_3 \text{ of } \text{N}(\text{CH}_3)_2;$

$Z = \text{O}, \text{NH} \text{ of } \text{CH}_2; \text{ en}$

$n = 2, 3 \text{ of } 4$

onder de voorwaarde dat wanneer $X = \text{NH}_2$ en $Z = \text{NH}$, Y geen NH is.

3. Peptide volgens conclusie 1 of 2, **met het kenmerk**, dat het gemodificeerde arginine-residue een citrulline-residu is.

4. Peptide volgens één der voorgaande conclusies, **met het kenmerk**, dat het peptide is gekozen uit de groep van peptiden met de formule II, III en IV.

5. Peptide volgens één van de conclusies 1 tot 3, **met het kenmerk**, dat het peptide een cyclisch peptide is.

6. Peptide volgens conclusie 5, **met het kenmerk**, dat het cyclische peptide de formule V heeft.

7. Peptide volgens één der voorgaande conclusies, **met het kenmerk**, dat het peptide een synthetisch peptide is.

8. Peptide volgens één der voorgaande conclusies, **met het kenmerk**, dat het antigeen (pro)filaggrine is, en het peptide reactief is met van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt afkomstig auto-immuunantilichamen reactief met (pro)filaggrine.

9. Peptide volgens één van de conclusies 1 tot 6, met het kenmerk, dat het peptide is verkregen door het proteolytisch behandelen van het antigeen, scheiding van door proteolyse gevormde peptidefragmenten en gevolgd door selectie op de aanwezigheid van een gemodificeerd arginine-residu in een bij de proteolytische behandeling gevormd peptide.

10. Antilichaam kruisreactief met een antilichaam opgewekt tegen een peptide volgens één van de conclusies 1 tot 9.

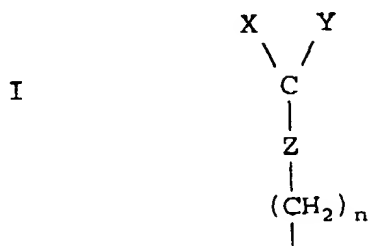
11. Antilichaam volgens conclusie 10, met het kenmerk, dat het antilichaam een monoklonaal antilichaam is.

12. Antilichaam volgens conclusie 10 of 11, met het kenmerk, dat het antilichaam is verkregen onder gebruikmaking van een peptide volgens één van de conclusies 1 tot 9 als antigeen.

13. Antilichaam volgens één van de conclusie 9 tot 12, met het kenmerk, dat het kruisreactief is met het antilichaam zoals dat wordt geproduceerd door Escherichia coli TG1 met plasmide RA3, gedeponeerd bij het Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Nederland, onder aanwinstnummer CBS143.96.

14. Werkwijze voor het detecteren van auto-immuunantilichamen, met het kenmerk, dat ten minste één immunologisch reactief molecuul gekozen uit de groep bestaande uit een peptide volgens één van de conclusies 1 tot 9 en een antilichaam volgens één van de conclusies 10 tot 13, in een immunologische test wordt toegepast.

1004539

FORMULEBLAD

II S H Q E S T X G R S R G R S G R S G S

III S H Q E S T R G X S R G R S G R S G S

IV S H Q E S T R G R S X G R S G R S G S

V H Q C H Q E S T X G R S R G R C G R S G S

└──┘



US 44071-A1/LM

Peptide derived from an antigen recognized by auto-antibodies from patients with rheumatoid arthritis, antibody directed against said peptide, and a method of detecting auto-immune antibodies

The present invention relates to a peptide derived from an antigen recognized by autoantibodies from patients with rheumatoid arthritis, which peptide is reactive with autoimmune antibodies from a patient suffering from rheumatoid arthritis.

Such a peptide is known from the European patent application 0 511 116 (Clonatec S.A.). This application describes an antigen comprising a filaggrin or pro-filaggrin fragment. The peptide is recognized by rheumatoid arthritis-specific autoimmune antibodies. Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease. It is the most commonly occurring inflammatory disease of the joints, it is chronic and may lead to severe physical unfitness.

The object of the present invention is to provide a peptide which is reactive with autoimmune antibodies from a patient suffering from rheumatoid arthritis, which peptide is suitable for diagnostic research with increased specificity while also being useful for other purposes such as obtaining (raising, selecting and isolating) poly- and monoclonal antibodies.

To this end the peptide according to the invention is characterized in that the derived peptide that is reactive with autoimmune antibodies, corresponds to a part of a mRNA molecule coding for the antigen, said part comprising a codon for an arginine residue, and the arginine residue in the derived peptide, which is reactive with autoimmune antibodies, is a modified arginine residue.

Surprisingly, the peptide according to the invention that possesses a modified arginine residue, proved to be very suitable for the specific diagnosis of rheumatoid arthritis.

To this day, no specific serological test is available for RA. The only test frequently employed is based on the determination of rheumatoid factors (RF; Ref. 1) which are found in 70% of the RA patients. However, this test is not very specific and is characterized by a relatively large number of false positives. For patients suffering from systemic lupus erythematosus the percentage of false positives is approximately 20% and for healthy individuals approximately 5%.

Preferably the peptide is characterized in that the modified arginine residue's side chain is a side chain according to Formula I on the formula sheet, in which

$X = \text{NH}_2, \text{CH}_3, \text{NHCH}_3 \text{ or } \text{N}(\text{CH}_3)_2;$

$Y = \text{O}, \text{NH}, \text{NHCH}_3 \text{ or } \text{N}(\text{CH}_3)_2;$

$Z = \text{O}, \text{NH} \text{ or } \text{CH}_2; \text{ and}$

$n = 2, 3 \text{ or } 4,$ on the condition that when $X = \text{NH}_2$ and $Z = \text{NH},$ Y is not $\text{NH};$ and the modified arginine residue is in particular a citrulline residue. For citrulline, $X = \text{NH}_2, Y = \text{O}, Z = \text{NH}$ and $n = 3.$

A preferred peptide is the peptide selected from the group of peptides having the Formula II, III and IV of the formula sheet.

By using the peptide according to Formula II, it is possible to establish the presence of rheumatoid arthritis in about 36% of patients actually suffering from rheumatoid arthritis, while the percentage of false positives for other autoimmune diseases and healthy individuals is less than 2%.

According to a favourable embodiment the peptide is a cyclic peptide, for instance, due to the presence of a cystine residue.

In some cases such a cyclic peptide exhibits an increased immunological affinity.

The preferred cyclic peptide is the peptide having the Formula V of the formula sheet.

Preferably the peptide is a synthetic peptide.

The reactive peptide according to the invention can be obtained pure and in large quantities by means of

organic synthesis, making immunological testing on a large scale possible.

According to an alternative embodiment, the peptide in accordance with the invention is characterized in that
5 the peptide is obtained by the proteolytic treatment of (pro)filaggrin, separation of peptide fragments formed by proteolysis and subsequent selection on the presence of a modified arginine residue in a peptide which was formed during the proteolytic treatment.

10 In this manner peptides can be identified which can increase the sensitivity of a rheumatoid arthritis test. The term sensitivity is in the present application to be understood to mean the ability of a test to properly identify a patient suffering from rheumatoid arthritis.

15 According to a favourable embodiment, the antigen is (pro)filaggrin, and the peptide is reactive with a rheumatoid arthritis patient's autoimmune antibodies which are reactive with (pro)filaggrin.

The peptide has been shown to be very suitable for
20 high-specificity testing (few false positives) for rheumatism.

The present invention also relates to an antibody which is cross-reactive with an antibody raised against a peptide according to the invention.

25 Such an antibody is useful for the indication of rheumatoid arthritis by analysing sections of biopsy samples and immunological tests of the sandwich type.

The antibody is preferably a monoclonal antibody.

According to another preferred embodiment, the
30 antibody is obtained by using as antigen a peptide in accordance with the invention.

A suitable antibody according to the invention is characterized in that it is cross-reactive with the antibody as produced by Escherichia coli TG1 with plasmid RA3,
35 deposited at the Centraalbureau voor Schimmelcultures, at Baarn, the Netherlands under accession number CBS143.96.

Finally, the invention relates to a method of detecting autoimmune antibodies against rheumatoid arthritis.

The method according to the invention is characterized in that in an immunological test at least one immunologically reactive molecule selected from the group consisting of a peptide according to the invention, and an antibody according to the invention is used.

In addition to increased sensitivity other advantages are achieved, in particular better reproducibility, quantitative information and better applicability for prognostic purposes.

The invention will now be explained in more detail by means of the following example.

Materials and methods

Peptide synthesis: Peptides were selected for synthesis on the basis of amino acid sequences derived from known cDNA sequences of human profilaggrin (Ref. 2; Ref. 3). The peptides were synthesized on solid phase using the method described by Schellekens et al. (Ref. 4). The peptides were at least 95% pure, as determined by the elution profile by means of reversed phase chromatography and the relative absorption at 214 nm. The composition of the peptides was confirmed by means of mass spectrometry (MALDI-MS). All peptides were synthesized as peptide amides.

TABLE 1

Synthesized peptides

The peptide names starting with "cf" are based on the C-terminal end (amino acids 306-324); and the peptide names starting with "nf" are based on the sequence near the N-terminal end (amino acids 18-32 for nfc1). Amino acid sequences based on cDNA of a profilaggrin repeat.

Name	Peptide sequence*
cfc1	S H Q E S T <u>X</u> G R S R G R S G R S G S
cfc2	S H Q E S T R G <u>X</u> S R G R S G R S G S
cfc3	S H Q E S T R G R S <u>X</u> G R S G R S G S
cf	S H Q E S T R G R S R G R S G R S G S
cfA	S H Q E S T A G R S R G R S G R S G S
cfE	S H Q E S T E G R S R G R S G R S G S
cfQ	S H Q E S T Q G R S R G R S G R S G S
nfc1	T G P S T R G R Q G S <u>X</u> H E
nf	E S S H G W T G P S T R G R Q G S R H E

* (A = alanine; G = glycine; H = histidine; E = glutamic acid; P = proline; R = arginine; Q = glutamine; S = serine; T = threonine; W = tryptophan; X = citrulline)

Detection by means of ELISA

Via an N-oxy succinimide surface the peptides were covalently coupled to the wells of 96-well microtitre plates (Costar amide binding plates) in an amount of 1 µg/well. Coupling took place for 16 hours at 4°C and pH 9.0. The plates were blocked for 1 hour with 2% bovine serum albumin. The sera were diluted 200 times in a diluent (0.3% BSA, 350 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1% vol./vol. Triton X-100, 0.5% w./vol. Na-deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with 10% normal rabbit serum, and incubated for one hour at room temperature. After washing the plates (3 times with PBS containing 0.05% by vol. of Tween®20), 100 µl of antihuman IgG conjugated with

peroxidase (Dako P214), 1000 times diluted in dilution buffer, was added to the wells. After incubation for 1 hour at room temperature, the plates were washed 3 times with PBS/Tween®, and bound antibodies were detected with tetramethyl benzidine as a substrate. After 10 minutes the reaction was stopped by adding 100 µl of 2 M sulphuric acid per well. Readout occurred at 450 nm. Sera having an OD₄₅₀ of 0.2, after deduction of the blank for the respective serum (a well without a coupled peptide), were considered to be positive.

Results

The results are listed in Table 2. In total, 288 sera from patients suffering from rheumatoid diseases were used, 132 of which were from patients suffering from rheumatoid arthritis.

TABLE 2

Results with peptide cfcl (Formula I of the formula sheet)

Serum description	n	number of positive sera %
RA (RF+)	109	42 (39%)
RA (RF-)	23	6 (26%)
Rheumatic disorders other than RA	156	2 (1.3%)
Systemische lupus erythematosus	50	0
Primary Sjögren's syndrome	35	0
Polymyositis/dermatomyositis	26	0
Healthy individuals	59	0

Of the total of 132 sera from patients suffering from rheumatoid arthritis, 48 were positive with the

peptide cfc1 (Formula I of the formula sheet). Therefore, when using peptide cfc1, the sensitivity was 36% (48/132). Sera were also reactive with the peptides cfc2 and cfc3 at percentages of 18% (24/132) and 26% (35/132), respectively. Of the 24 sera that were reactive with cfc2 13, were not reactive with cfc1. Thus the peptide cfc2 improves the sensitivity of the test by 10%. Of the 35 sera that were reactive with cfc3, no sera were not reactive with cfc1 and cfc2. Thus when used in combination with cfc1 and cfc2, peptide cfc3 does not contribute to an increased sensitivity of the test. It should be noted that these percentages depend on the specificity-threshold value applied by applicants. The same data (from the ELISA experiments) can be interpreted as a sensitivity of approximately 50-60% by choosing a slightly lower sensitivity, which incidentally, is still much better than the one obtainable when using the known rheumatoid factor test (Ref. 1).

Sera from patients suffering from various infectious diseases (borrhelia, syphilis, malaria, endocarditis, Legionella, tuberculosis, mycoplasma, Chlamydia, Yersinia, salmonella, parvovirus B19, Epstein-Barr virus, rubella, schistosomiasis, Toxoplasma, leishmaniasis, Chagas' disease) were tested for the presence of antibodies reactive with cfc1. Of the 308 tested sera 9 were positive. This means that the specificity was 97%, a considerable improvement compared with the RF test.

Variants of cfc1 wherein citrulline was replaced by a neutral (alanine; cfA), acid (glutamic acid; cfE) or amide (glutamine; cfQ) residue, did not seem to be immunologically reactive. The same applies to the control peptide cf, which does not possess a modified arginine residue.

With the aid of the above-described ELISA, a cyclic variant (with the Formula V of the formula sheet, in which two cysteine residues (C) are bound by means of a sulphur bridge) of cfc1 was tested for 132 RA sera. This cyclic variant was shown to be reactive with 83 sera (63%), signifying an increase in sensitivity. Of the 156 sera of

patients suffering from rheumatic diseases other than RA,
5 were shown to be positive (specificity 97%).

A second citrulline-substituted peptide (nfc1) was
shown to be specifically reactive with 10% of the RA sera,
5 but not with the control peptide nf, which does not com-
prise citrulline. Of the RA sera reactive with nfc1, most
were not reactive with cfcl. Therefore, it is possible to
increase the sensitivity of a test for rheumatoid arthri-
tis by applying more peptides comprising a modified
10 arginine residue.

Obviously, a peptide may comprise several modified
arginine residues, but the peptide may also comprise one
or more non-modified arginine residues.

Applicants believe that modified amino acids, in
15 particular those derived from arginine residues, could
possibly also play a role in other autoimmune diseases.
For this reason, the invention is also aimed at peptides
comprising modified amino acids that are reactive with
auto-antibodies from patients suffering from autoimmune
20 diseases other than RA.

REFERENCES

- 1) Smolen, J.S., (1996) Autoantibodies in rheumatoid arthritis, in Manual of biological markers of disease (W.J. van Venrooij and R.N. Maini, red.) vol. C Chapter 1.1 pp. 1-18. Kluwer Scientific Publishers, Dordrecht.
5
- 2) McKinley-Grant, L.J., Idler, W.W., Bernstein, I.A., Parry, D.A.D., Cannizzaro, L., Croce, C.M., Huebner, K., Lessin, S.R. & Steinert, P.M. (1989) Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21. Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. 86, pp. 4848-4852.
10
15
- 3) Gan, S.Q., McBride, O.W., Idler, W.W., Nedialka, M. & Steinert, P.M. (1990) Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. Biochemistry 29, pp. 9432-9440.
20
- 4) Schellekens, G.A., Lasonder, E., Feijlbrief, M., Koedijk, D.G.A.M., Drijfhout, J.W., Scheffer, A.J., Welling-Wester, S & Welling, G.W. (1994) Identification of the core residues of the epitope of a monoclonal antibody raised against glycoprotein D of herpes simplex virus 1 by screening of a random peptide library. The European Journal of Immunology 24, pp. 3188-3193.
25

CLAIMS

1. A peptide derived from an antigen recognized by autoantibodies from patients with rheumatoid arthritis, which peptide is reactive with autoimmune antibodies from a patient suffering from rheumatoid arthritis, **characterized** in that the derived peptide that is reactive with autoimmune antibodies, corresponds to a part of a mRNA molecule coding for the antigen, said part comprising a codon for an arginine residue, and the arginine residue in the derived peptide, which is reactive with autoimmune antibodies, is a modified arginine residue.

2. A peptide according to claim 1, **characterized** in that the modified arginine residue comprises a side chain according to Formula I of the formula sheet, in which

X = NH₂, CH₃, NHCH₃ or N(CH₃)₂;

Y = O, NH, NHCH₃ or N(CH₃)₂;

Z = O, NH or CH₂; and

n = 2, 3 or 4, on the condition that when X = NH₂ and Z = NH, Y is not NH.

3. A peptide according to claim 1 or 2, **characterized** in that the modified arginine residue is a citrulline residue.

4. A peptide according to one of the preceding claims, **characterized** in that the peptide is selected from the group of peptides having the Formula II, III and IV.

5. A peptide according to one of the claims 1 to 3, **characterized** in that the peptide is a cyclic peptide.

6. A peptide according to claim 5, **characterized** in that the cyclic peptide has the Formula V.

7. A peptide according to one of the preceding claims, **characterized** in that the peptide is a synthetic peptide.

8. A peptide according to one of the preceding claims, **characterized** in that the antigen is (pro)filaggrin, and the peptide is reactive with a rheumatoid arthritis

patient's autoimmune antibodies which are reactive with (pro)filaggrin.

9. A peptide according to one of the claims 1 to 6, **characterized** in that the peptide is obtained by the proteolytic treatment of (pro)filaggrin, separation of peptide fragments formed by proteolysis and subsequent selection on the presence of a modified arginine residue in a peptide which was formed during the proteolytic treatment.

10. An antibody which is cross-reactive with an antibody raised against a peptide according to one of the claims 1 to 9.

11. An antibody according to claim 10, **characterized** in that the antibody is a monoclonal antibody.

12. An antibody according to claim 10 or 11, **characterized** in that the antibody is obtained by using a peptide according to one of the claims 1 to 9 as an antigen.

13. An antibody according to one of the claims 9 to 12, **characterized** in that it is cross-reactive with the antibody as produced by Escherichia coli TG1 with plasmid RA3, deposited at the Centraalbureau voor Schimmelcultures, at Baarn, the Netherlands under accession number CBS143.96.

14. A method for the detection of autoimmune antibodies, **characterized** in that in an immunological test at least one immunologically reactive molecule selected from the group consisting of a peptide according to one of the claims 1 to 9 and an antibody according to one of the claims 10 to 13 is used.

ABSTRACT

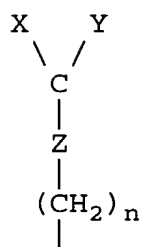
5 The invention relates to a peptide derived from an
antigen recognized by autoantibodies, which peptide is reac-
tive with autoimmune antibodies from a patient suffering from
rheumatoid arthritis. The peptide according to the invention
possesses a modified arginine residue. The invention also
relates to antibodies against the peptide and a method of
10 detecting autoimmune antibodies. Licensing possible.

5

FORMULA SHEET

10

I



15

II

S H Q E S T X G R S R G R S G R S G S

20

III

S H Q E S T R G X S R G R S G R S G S

IV

S H Q E S T R G R S X G R S G R S G S

25

V

 H Q C H Q E S T X G R S R G R C G R S G S